

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 137 292
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 84110414.4

(51) Int. Cl.⁴: B 01 L 3/14

(22) Anmeldetag: 01.09.84

(30) Priorität: 08.09.83 FI 833207

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.04.85 Patentblatt 85/16(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE DE GB IT NL SE(71) Anmelder: Farnos-Yhtymä Oy
P.O. Box 425
SF-20101 Turku 10(FI)(72) Erfinder: Peltonen, Pekka Sakari
Väästäräkinpolku 4 B 52
SF-20600 Turku 60(FI)(72) Erfinder: Juhala, Pentti Juhani
Vuolahti
SF-21620 Kuusisto(FI)(72) Erfinder: Hautoniemi, Lasse Martti
Ampumakentäntie 11 N 64
SF-20360 Turku 36(FI)(74) Vertreter: Masch, Karl Gerhard et al,
Patentanwälte Andrejewski, Honke & Partner
Theaterplatz 3 Postfach 10 02 54
D-4300 Essen 1(DE)

(54) Reaktionsbehälter für immunologische Analysen.

(57) Der erfindungsgemäße Reaktionsbehälter für immunologische Analysen hat rohrförmige Gestalt und der Teil am oder nahe seinem geschlossenen Ende ist in mehrere miteinander verbundene Abteile unterteilt, indem Sicken oder Trennwände in Form von Rippen (S) Flanschen in der Rohrwandung des Behälters vorgesehen sind oder der Behälter durch den Zwischenraum von zwei coaxialen Röhren mit unterschiedlichen Radien geformt ist, wobei die Wandungen der Rohre ebenfalls mit Falten oder dergleichen versehen sein können. Der Reaktionsbehälter ist vorzugsweise aus einem hydrophile funktionelle Gruppen enthaltenden Material hergestellt, an welches sich der Antikörper chemisch bindet, wodurch Rohre in gleichmäßiger Qualität erzielbar sind, welche sich gut lagern lassen. Das zu analysierende Antigen wird schnell von dem an der Wandung des Reaktionsbehälters fixierten Antikörper gebunden.

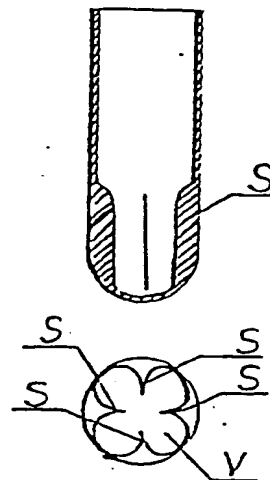


FIG. 2

EP 0 137 292 A2

- 1 -

Reaktionsbehälter für immunologische Analysen

Die Erfindung betrifft einen rohrförmigen Reaktionsbehälter für immunologische Analysen, welcher zumindest an seinem geschlossenen oder unteren Ende eine Innenwandung aufweist, an welcher ein Antikörper fixiert ist, welcher den zu analysierenden Bestandteil (Antigen) und den markierten Bestandteil (markiertes Antigen) an sich bindet.

Man kennt bereits Reaktionsbehälter, welche aus einem Reagenzglas oder Teströhrchen bestehen und deren innere Wandung mit einem Antikörper überzogen ist. Man kennt auch Systeme, bei denen man in ein herkömmliches unbehandeltes Reagenzglas eine Kugel oder einen anders geformten Einsatz hineinfallen läßt, welcher mit einem Antikörper beschichtet ist, welcher den zu analysierenden Bestandteil und den markierten Bestandteil an sich bindet (US-Patentschriften 4 320 087 und 4 225 575).

Ein Nachteil der vorgenannten Reaktionsbehälter besteht darin, daß eine Bindung des zu analysierenden Antigens und des markierten Bestandteils an den Antikörper oder an die mit dem Antikörper beschichtete Kugel oder den ähnlichen Einsatz im Reagenzglas langsam vor sich geht. Der Grund dafür ist darin zu sehen, daß die Bindungsreaktionsgeschwindigkeit durch die Diffusion des zu analysierenden Bestandteils (Antigen) und des markierten Bestandteils (markiertes Antigen) innerhalb der Lösung im Rohr an die Wandungen des Rohres bestimmt wird. Bei einem herkömmlichen Reagenzglas sind die Diffusionsentfernungen groß und geht die Bindung langsam vor sich. Wenn die Abmes-

5 sung des Moleküls zunimmt, nimmt seine Diffusionsgeschwindigkeit ab, wodurch die Analyse von beispielsweise makromolekularen Protein-
hormonen langsam vor sich geht. Die Verwendung einer mit einem Antikörper beschichteten Kugel erhöht die Bindungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Verwendung eines beschichteten Reagenzglases nicht wesentlich. Auch bringt das Einsetzen einer Kugel oder eines ähnlichen Objektes in das Reagenzglas einen weiteren Arbeitsschritt mit sich. Außerdem ist die Handhabung und Lagerung getrennter Elemente für ein Reaktionsbehältersystem unbequem und die mit Antikörper beschichtete Oberfläche des einzusetzenden Elementes kann leicht beschädigt werden, was zu ungenauen Analyseresultaten führt.

15 Die als Reaktionsbehälter verwendeten Reagenzgläser oder die Kugeln und ähnliche Gegenstände sind im allgemeinen aus Polystyrol oder Polypropylen hergestellt. Der Antikörper wird an ihrer Oberfläche durch Adsorption oder in mehreren Stufen chemisch fixiert. Eine derartige Fixierung ist umständlich und die gleichmäßige Beschichtung von Hunderten oder Tausenden von Reagenzgläsern in einer oder mehreren Partien ist äußerst schwierig.

25 Der erfindungsgemäße Reaktionsbehälter überwindet die vorgenannten Nachteile und ist im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Innenwandung des Reaktionsbehälters an und neben seinem geschlossenen Ende dadurch vergrößert ist, daß in ihr eine oder mehrere parallel zur Längsachse des Behälters verlaufende, in den Behälter hineinragende und in die Behälterwandung integrierte Flächen vorgesehen sind.

- Nach einem Vorschlag der Erfindung ist der Behälter mit Sicken oder Windungen versehen. Alternativ ist der Reaktionsbehälter durch Trennwände in mehrere Abteile derart unterteilt, daß die Flüssigkeit ungehindert vom einen Abteil zu einem anderen fließen kann. Der erfindungsgemäße Reaktionsbehälter kann auch aus einem Rohr bestehen, welches ein zweites koaxiales Rohr mit kleinerem Durchmesser umschließt, wobei letzteres vom Boden aus nach oben ragt.
- 10 Erfindungsgemäß ist der untere oder geschlossene Teil des Reaktionsbehälters mit wenigstens einem und zweckmäßigerweise mit nicht mehr als acht Sicken, vorzugsweise in symmetrischer Anordnung über den Umfang verteilt, versehen. Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausbildung ist der Behälter mit vier bis sechs
- 15 symmetrisch angeordneten Sicken versehen. Jede Sicke kann von der Wandung in den Reaktionsbehälter um ein Stück hineinragen, welches etwa $1/8$ bis etwas weniger als $1/2$, wie beispielsweise $1/8$ bis etwa $5/12$, vorzugsweise $1/5$ bis $1/3$ des Innendurchmessers des Behälterquerschnittes entspricht, um einerseits die Dif-
- 20 fusionsabstände ausreichend zu verkürzen und andererseits dennoch eine ungehinderte Strömung der Flüssigkeit im Behälter zu ermöglichen. Die Längsausdehnung der Sicken erlaubt ein schnelles und sauberes Entleeren des Behälters. Die Sicken erstrecken sich in Längsrichtung des Reaktionsbehälters über eine Länge,
- 25 welche ausreicht, um über den Spiegel der Probe im Rohr hinauszureichen. Diese Länge beträgt beispielsweise im allgemeinen etwa $1/4$ bis $1/2$, insbesondere etwa $1/3$ der Länge des Behälters, wenn der Behälter die Form eines Mikroreagenzrohres besitzt.

Nach einem zweiten Vorschlag der Erfindung kann der Reaktionsbehälter mit Trennwänden versehen sein, welche in den Behälter hineinragen und derart ausgebildet sind, daß die Flüssigkeit zwischen den verschiedenen Teilen des Behälters ungehindert fließen kann. Die Trennwände können beispielsweise Flansche sein und im allgemeinen rechtwinklig zur Wandung des Behälters verlaufen oder sie können die Form von Rippen haben. Die vorgenannten Forderungen in Verbindung mit der Ausführung der Sicken gilt auch in diesem Fall in Bezug auf die Anzahl der Wandungen oder Rippen, ihre Länge und ihre Ausdehnung in den Behälter hinein.

Ein besonders vorteilhafter Reaktionsbehälter ist ein Testrohr, dessen unteres oder geschlossenes Ende mit fünf symmetrisch angeordneten Rippen in der Rohrwandung versehen ist, welche sich von der Wandung aus in das Rohr um ein etwa einem $\frac{1}{3}$ des Innendurchmessers des Rohrquerschnittes entsprechendes Stück erstrecken.

Gemäß einem dritten Ausführungsbeispiel besteht der Reaktionsbehälter aus zwei coaxialen Rohren unterschiedlichen Durchmessers, wobei das Innenrohr sich vom Boden des Außenrohres nach oben erstreckt und dadurch zwischen beiden ein kreisringförmiger Reaktionsraum begrenzt wird. Das Innenrohr kann dadurch ausgebildet werden, daß der Boden des Außenrohres in das Rohr zu dessen Mündung hin eingedrückt wird. Alternativ kann das Innenrohr auch an der Bodeninnenfläche des Außenrohres auf irgendwie geeignete Weise befestigt werden. Die Weite des Ringrau-

- mes kann schwanken, beträgt jedoch zweckmäßigerweise etwa 1/5 bis 1/3 des Innendurchmessers des Außenrohres. Eines oder beide der koaxialen Rohre können auch mit Sicken oder Rippen oder Flanschen versehen werden, wie dies im Zusammenhang mit der Ausführung aus einem einzigen Rohr beschrieben wurde. Dabei sind das Innen- und das Außenrohr vorzugsweise mit der gleichen Anzahl von beispielsweise Sicken versehen, welche ineinandergreifen (Fig.4).
- 10 Der erfindungsgemäße Reaktionsbehälter ist vorzugsweise aus einem Kunststoff oder einem anderen, hydrophile funktionelle Gruppen enthaltenden Material hergestellt, wie beispielsweise $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{NH}_2$ usw.. Geeignete Kunststoffe für den Reaktionsbehälter sind beispielsweise Polyakrylat-Äthylen-Copolymere; Polystyrol-derivate, wie beispielsweise Polyaminostyrol, Polystyrolakrylnitril oder Polyvinylbenzylchlorid; Polyhydroxyäthylmetakrylat, Tris-akryl- NH_2 .
- 15
- 20 Versuche haben gezeigt, daß in dem erfindungsgemäßen Reaktionsbehälter der an der Wandung des Behälters fixierte Antikörper sehr schnell den zu analysierenden Bestandteil (Antigen) und den markierten Bestandteil (markiertes Antigen) aus der Lösung an sich bindet (Fig. 5). Mit dem erfindungsgemäßen Reaktionsbehälter können die immunologischen Analysen schnell durchgeführt werden und die Möglichkeit von Fehlern nimmt ab, da
- 25 die Bindungsreaktion fast bis zum Ende vor sich gehen kann, bevor die Lösung aus dem Behälter entfernt wird und die Menge des an der Wandung gebundenen markierten Bestandteils gemes-

sen wird. Dies bedeutet einen eindeutigen Vorteil für den Benutzer, wenn im allgemeinen täglich Hunderte von Analysen durchgeführt werden müssen.

- 5 Der Antikörper wird erfindungsgemäß am Reaktionsbehälter auf einfache und zuverlässige Weise fixiert, da das Material des Reaktionsbehälters funktionelle Gruppen enthält.

10 Die Erfindung wird nachstehend anhand der beiliegenden Zeichnung im einzelnen erläutert; es zeigt

Fig. 1 einen Reaktionsbehälter, dessen unteres Teil gewunden ist oder mit Sicken versehen ist, und zwar im Längsschnitt und im Querschnitt;

15 Fig. 2 einen Längs- und einen Querschnitt eines Reaktionsbehälters, welcher durch Trennwände in einzelne Abteile unterteilt ist;

20 Fig. 3 einen Längs- und einen Querschnitt eines Reaktionsbehälters, der aus zwei koaxialen Rohren mit unterschiedlichen Durchmessern gebildet ist;

25 Fig. 4 einen Querschnitt eines Reaktionsbehälters gemäß Fig. 3, bei welchem das Innen- und das Außenrohr mit Windungen oder Sicken versehen ist und

Fig. 5 das Bindevermögen des zu analysierenden Bestandteils (Antigen) und des markierten Bestandteils (markiertes Antigen) als eine Funktion der Zeit bei einer Messung mit einem erfindungsgemäßen Reaktionsbehälter (Kurve A) bzw. mit einem herkömmlichen Testrohr (Kurve B).

- Bei der Ausführung gemäß Fig. 1 ist die Oberfläche der Wandung des Reaktionsbehälters oder Rohres dadurch vergrößert, daß in der Wandung vier Windungen oder Sicken P vorgesehen sind, welche sich über einen Teil der Rohrlänge erstrecken. Auf diese Weise wird auch der flüssigkeitsgefüllte Raum V im Rohr etwas enger. Bei dieser Ausführung beträgt der Abstand zwischen zwei einander gegenüberliegenden Sicken etwa die Hälfte des Rohrdurchmessers. Gleiche Eigenschaften ergeben sich bei dem Reaktionsbehälter gemäß Fig. 2, bei welchem der Flüssigkeitsraum V durch Trennwände oder Rippen S in vier Abteile unterteilt ist, welche in den Behälter um ein etwa $1/3$ des Durchmessers entsprechendes Stück hineinragen. In Fig. 3 ist der Flüssigkeitsraum V durch zwei koaxiale Rohre T_1 und T_2 unterschiedlichen Durchmessers definiert. In Fig. 4 wird der Flüssigkeitsraum zwischen zwei koaxialen Rohren wie in Fig. 3 ausgebildet, doch sind das Außenrohr X und das Innenrohr Y mit Windungen oder Sicken P entsprechend denen der Fig. 1 versehen.
- Der erfindungsgemäße Reaktionsbehälter wird wie folgt verwendet: Die Testprobe und der markierte Bestandteil werden in den Reaktionsbehälter eingebracht. Daraufhin bindet sich das Antigen in der Probe und das markierte Antigen, welches als der mar-

- 8 -

kierte Bestandteil fungiert, an den Antikörper an der Wandung des Reaktionsbehälters. Wenn die Bindungsreaktion weit genug fortgeschritten ist, wird die Lösung aus dem Reaktionsbehälter abgegossen und die Menge des an der Wandung des Reaktionsbehälters anhaftenden markierten Bestandteils gemessen. Die Menge an markiertem Bestandteil kann auch aus der aus dem Reaktionsbehälter ausgegossenen Lösung gemessen werden. Das Analyseverfahren hängt von dem verwendeten markierten Bestandteil ab. Die Fixierung des Antikörpers an der Wandung des Reaktionsbehälters erfolgt durch chemische Bindung des Antikörpers an die funktionellen Gruppen des Materials, aus welchem der Reaktionsbehälter besteht.

Auf diese Weise erhält man gleichmäßige Reaktionsbehälter, und zwar selbst bei Herstellung in großen Serien, während außerdem eine einwandfreie Lagerung ermöglicht wird. Aufgrund der Form des erfindungsgemäßen Reaktionsbehälters geht die Bindung des Antigen und des markierten Bestandteils an dem an der Wandung des Reaktionsbehälters fixierten Antikörpers sehr schnell vor sich. Mit dem erfindungsgemäßen Reaktionsbehälter lassen sich alle derartigen Substanzen und Substanzkombinationen analysieren, welche eine immunologische Analyse erlauben. Bei dem an der Wandung des Reaktionsbehälters fixierten "Antikörper" kann es sich auch um ein Antigen handeln.

Patentansprüche:

1. Rohrförmiger Reaktionsbehälter für immunologische Analysen, welcher zumindest an und neben seinem geschlossenen Ende eine Innenwandung aufweist, an welcher ein Antikörper fixiert ist, an welchen sich der zu analysierende Bestandteil und ein markierter Bestandteil einer Lösung im Reaktionsbehälter binden, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Oberfläche der Innenwandung des Reaktionsbehälters am und nahe seinem geschlossenen Ende dadurch vergrößert ist, daß in der Innenwandung eine oder mehrere parallel zur Längsachse des Behälters verlaufende, in den Behälter hineinragende und in die Behälterwandung integrierte Flächen ausgebildet sind.
2. Reaktionsbehälter nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Flächen durch radial nach innen weisende Sicken (P) oder Windungen in der Behälterwandung gebildet sind.
3. Reaktionsbehälter nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Flächen aus in der Innenwandung des Behälters ausgebildeten, radial nach innen weisenden Rippen (S) oder Flanschen bestehen.
4. Reaktionsbehälter nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fläche dadurch gebildet ist, daß das Bodenteil des Behälters in den Behälter in Richtung auf dessen Öffnung über einen im wesentlichen der Reaktionsfläche entsprechenden Teil eingepreßt ist.

- 10 -

5. Reaktionsbehälter nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fläche dadurch gebildet ist, daß auf der inneren Bodenwandung des Behälters ein koaxiales Rohr (T_2) kleineren Durchmessers befestigt ist.
- 5 6. Reaktionsbehälter nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß eines der Rohre mit radial verlaufenden Sicken oder Rippen oder Flanschen versehen ist.
- 10 7. Reaktionsbehälter nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß beide Rohre (X, Y) mit Sicken (P) oder Rippen oder Flanschen versehen sind.
- 15 8. Reaktionsbehälter nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Sicken oder Rippen oder Flansche in dem einen Rohr und die im zweiten Rohr ineinandergreifen.
- 20 9. Reaktionsbehälter nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter mit höchstens acht, vorzugsweise vier bis sechs Sicken oder Rippen oder Flanschen versehen ist.
- 25 10. Reaktionsbehälter nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sicken oder Rippen oder Flansche in den Reaktionsbehälter um $1/8$ bis etwas weniger als $1/2$, beispielsweise um $1/8$ bis $5/12$, vorzugsweise um $1/5$ bis $1/3$, des Innendurchmesser des Behälters hineinragen.

- 11 -

11. Reaktionsbehälter nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einem hydrophile funktionelle Gruppen enthaltenden Material besteht.

- 5 12. Reaktionsbehälter nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Material aus der Gruppe der Polyakrylat-Äthylen-Copolymere; Polystyrolerivate, wie beispielsweise Polyaminostyrol, Polystyrolakrylonitril oder Polyvinylbenzylchlorid; Polyhydroxy-
10 äthylmetakrylat; Tris-akryl-NH₂ ausgewählt ist.
-

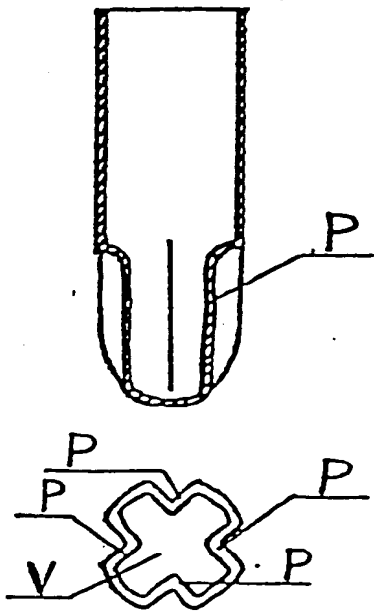


FIG. 1

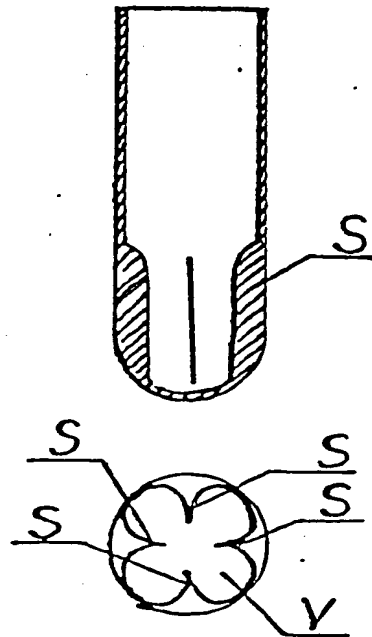


FIG. 2

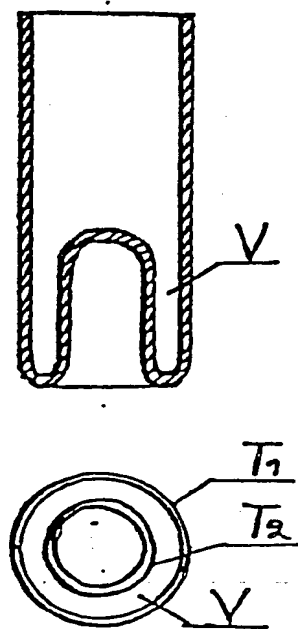


FIG. 3

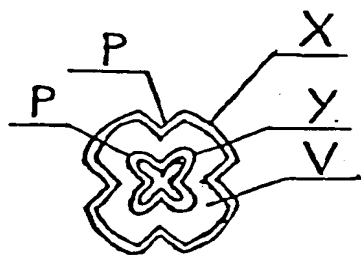


FIG. 4

2/2

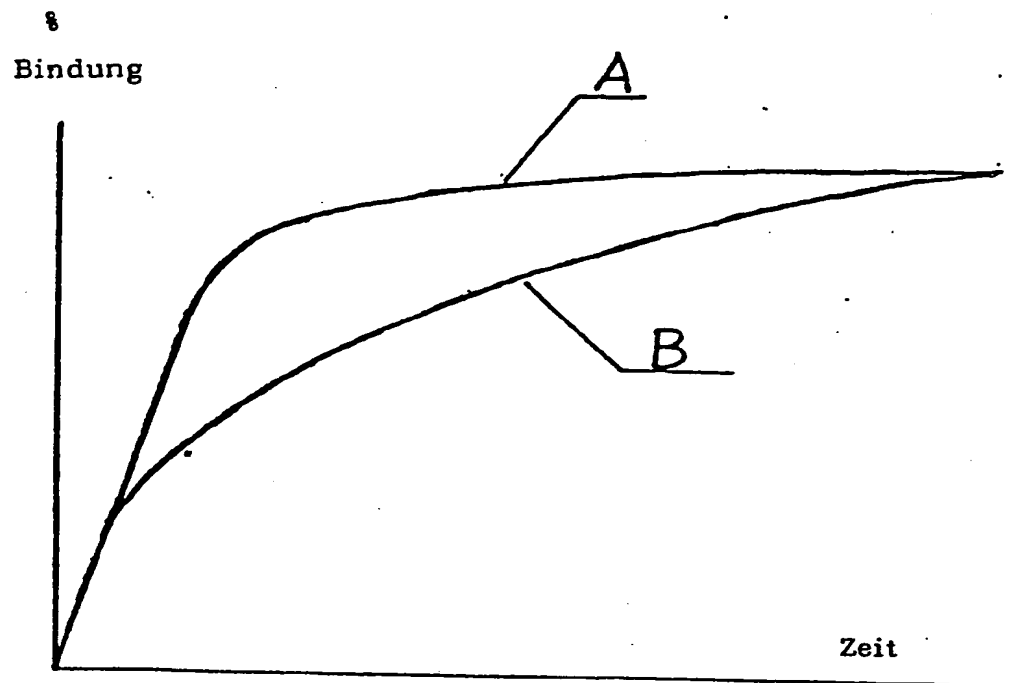


FIG. 5